



TITLE:

Critical Functionality Effects from Storage Temperature on Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Suspensions(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kitahata, Shohei

CITATION:

Kitahata, Shohei. Critical Functionality Effects from Storage Temperature on Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Suspensions. 京都大学, 2019, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21685>

RIGHT:

許諾条件により要旨は2019-04-01に公開

京都大学	博士（ 医 学）	氏 名	北畑 将平
論文題目	Critical Functionality Effects from Storage Temperature on Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Suspensions （ヒト iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞懸濁液の非凍結条件下における保存温度の影響）		
（論文内容の要旨）			
<p>加齢黄斑変性症（AMD）は主要な失明原因の一つであり、網膜色素上皮細胞（RPE）の機能障害を伴う。網膜再生医療研究開発プロジェクトチームは2014年に滲出性AMD患者に対してヒト人工多能性幹細胞由来RPE（iPS-RPE）の自家移植を行った。自家移植は拒絶反応の点で利点があるものの分化誘導に膨大な時間と費用を要するため、HLAが一致した患者に対する他家移植が期待されている。他家移植の普及には細胞準備から移植までの工程において利便性の高い方法が望まれ、解凍作業や細胞障害を生じる凍結保存を回避した保存方法の確立が必要である。本研究では閉鎖系の保存容器に対し制御可能な温度に着目し、非凍結条件下で保存温度が細胞に与える影響を検討した。</p> <p>iPS（253G1）-RPE 細胞懸濁液（1.0×10^6/200μl）を Nunc 社製の保存チューブに各温度条件（4, 16, 25, 37℃）で最大 5 日間静置し、生細胞率、アネキシン V を用いたアポトーシス検出、代謝関連物質、低酸素応答、微小管構造、サイトカイン分泌（VEGF, PEDF）を評価した。また回転運動の付加、接着性培養皿と非接着性培養皿での培養、添加因子共存下での保存等を行い、静置や細胞接着等の影響を比較検討した。さらに保存後の細胞に対して細胞増殖能、サイトカイン分泌能、細胞形態、遺伝子発現を確認した。チューブ静置後の細胞生存率は、開始 6 時間までは各温度で有意差が認められなかったが 24 時間以降は 16℃が最も高く、5 日後でも 70%以上であった。16℃で各期間保存した細胞の増殖能やサイトカイン分泌能、形態、主要遺伝子の発現量等を確認したが保存していない細胞と比較しても差異は認められなかった。この様な生細胞率への影響を詳細に検証するため、まずアポトーシス判定キットで評価したところ全ての温度でアネキシン V 陽性のアポトーシス優位であったが、37℃ではネクローシスも観察された。37℃で接着性培養皿と非接着性培養皿を比較したところ細胞間や足場への接着が抑制される後者でのみ細胞死（Anoikis）が認められた。次に細胞接着が抑制される非接着性培養皿による培養とチューブ静置条件を各温度で比較した。チューブの生細胞率は 4℃では非接着性培養皿よりも上昇していたが、37℃では低下していた。また ROCK 阻害剤を添加したところ 25℃および 37℃では生存率の改善が認められたが 4℃および 16℃では変化が見られなかった。さらに非接着性培養皿の 4℃において微小管構造の破壊が認められたのに対して、チューブ静置条件では温度が高いほどミトコンドリア活性、グルコース消費量、乳酸産生量が増加し、低酸素プローブ活性も増強された。チューブ静置条件では非接着性培養皿と異なり面積の狭いチューブ底に細胞が堆積するため、これを解消する目的でチューブを 37℃で常時回転させたところ生細胞率の改善を認めた。また 37℃チューブ静置条件では VEGF 分泌量の上昇と PEDF の低下を認め、RPE 細胞の低酸素応答に関する過去の報告と一致した。そこで低酸素</p>			

障害を緩和するプロサイモシン由来ペプチド（P6Q）を 37℃静置条件で添加したところ生存率の改善が認められた。iPS-RPE 細胞懸濁液を非凍結条件下で保存するのに適した温度は 16℃であり、本研究で検証した限り生存細胞は保存前と同等であった。細胞懸濁液は Anoikis を生じたが、4℃では細胞の微小管構造の破壊、37℃では低酸素障害が細胞死に関与し、特に保存チューブ静置時に生じる細胞堆積が 4℃では細胞保護に働き、37℃では低酸素状態を誘導する可能性が示唆された。この非凍結条件下での保存は凍結保存と比較し費用や労力の面で上回るため、iPS-RPE 細胞を用いた再生医療の普及に貢献し得る。またこれらのメカニズムは、iPS-RPE 細胞特異的なものではなく他の細胞でも生じ得るものであり、本研究の成果を汎用的な概念として他の細胞においても適用できる可能性がある。
（論文審査の結果の要旨） ヒト人工多能性幹細胞由来の網膜色素上皮（hiPSC-RPE）細胞懸濁液は、加齢黄斑変性症など難治性の疾患に対する活用が期待されている。しかしながら、一般に普及し得る治療法として確立するためには細胞の同質性を確保しつつ煩雑さやコスト等の課題を克服した保存法の開発が必須である。申請者は、汎用的な閉鎖系保存容器に対して唯一制御可能な温度に着目し、利便性の高い非凍結条件下において温度が hiPSC-RPE に与える影響を検証した。その結果、最も長期間生細胞を維持できる温度は 16℃であることを示し、保存していない細胞と比較しても細胞の形態や RPE の典型的な分子マーカーの発現量に差異がないことを実証した。次に細胞死のメカニズムを詳細に検証し、基本的にはアネキシン V 陽性のアポトーシスが生じているが、37℃ではネクローシスによる細胞死も優位に起こること、一般的な非接着培養では 4℃特異的に微小管構造の破壊が顕著に認められたのに対して保存チューブ内では 4℃での微小管構造の破壊が緩和されること、チューブ内では高温ほど代謝の亢進を伴って低酸素プローブ活性が増強されることを確認した。つまり単細胞化で生じる Anoikis を定説通り確認するだけでなく、温度と容器内での細胞の堆積・分散状態に着目し、冷蔵に用いる温度における微小管構造の破壊と細胞の堆積による保護、通常の培養温度（37℃）における堆積細胞への低酸素障害の可能性を新たに示した。
以上の研究は iPS-RPE 細胞懸濁液の非凍結下における保存温度の影響と細胞死メカニズムの解明に貢献し細胞を用いた再生医療の発展や普及に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 31 年 2 月 27 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
要旨公開可能日： 年 月 日以降